Parijs 1971

ORSAY

Série A

N° d'Ordre : 830

"CONTRIBUTIONS A L'ETUDE DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

ET DE LEURS CATALYSEURS BIOCHIMIQUES

- Biosynthèse des ménaquinones bactériennes
- Etude du transport du phosphate à travers la membrane mitochondriale "

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Physiques

enregistrée au C.N.R.S. sous le n° AO 4.079

GUERIN-BRIERE Martine

Soutenue le 8 JUILLET 1971 à la Faculté des Sciences d'ORSAY

devant le jury :

MM. E. LEDERER

H. CLAUSER

P. VOLFIN

R. AZERAD

Eur. J. Biochem. 15 (1970) 421—427

Biosynthèse du noyau naphtoquinonique des ménaquinones bactériennes

M. Guérin, Mireille M. Leduc et Robert G. Azerad

Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay

(Reçu le 9 janvier/1 juin 1970)

Incorporation of some ^{14}C- or ^{3}H-labeled compounds in menaquinones of various Gram + or Gram — bacteria has been tried during bacterial growth or with resting cells of *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium avium*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Aerobacter aerogenes*, and *Proteus vulgaris*. [^{14}C]*p*-Hydroxybenzaldehyde and [^{3}H]3,4-dihydroxybenzaldehyde are not incorporated into the menaquinones; [^{14}C-ring labeled]*p*-hydroxybenzaldehyde is incorporated into ubiquinone-8 of *P. vulgaris*. [U-^{14}C]shikimic acid (or [1,2-$^{14}C_2$]shikimic acid) are good precursors of the naphthoquinone ring of *M. phlei* menaquinone. Only a slight incorporation of [1-^{14}C]α-naphthol into menaquinones could be demonstrated, except with a mutant strain of *A. aerogenes* which incorporated also with a high yield [^{14}C]2-methyl-1,4-naphthoquinone and [^{14}C]1,4-naphthoquinone. A comparison of radioactivity dilutions of these precursors indicated that menadione is probably not a true intermediate in menaquinone biosynthesis.

Si on connaît actuellement la plupart des intermédiaires de la biosynthèse du noyau benzoquinonique des ubiquinones [1,2], il n'en est pas encore de même pour celle du noyau naphtoquinonique des ménaquinones. Cependant, les premiers résultats obtenus dans ce domaine ont montré que l'acide D-shikimique constituait le précurseur direct de la partie aromatique du noyau naphtoquinonique, aussi bien pour les ménaquinones bactériennes [3—6] que pour plusieurs naphtoquinones sans chaîne latérale isolées des végétaux [7—9].

Différents composés aromatiques ont été depuis impliqués comme intermédiaires possibles entre l'acide shikimique et la 1,4-naphtoquinone: divers acides aromatiques [10], l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque [4,6], l'acide *p*-hydroxybenzoïque [11] et l'α-naphtol [7]. La préparation de ces composés marqués et les tentatives d'incorporation effectuées chez les plantes ou les bactéries ont conduit à éliminer certains d'entre eux; pour d'autres, les résultats demeurent contradictoires [5,12].

Dans ce travail, nous décrivons les résultats obtenus pour des essais d'incorporation d'acide [^{14}C]shikimique, d'aldéhyde [^{14}C]*p*-hydroxybenzoïque, d'aldéhyde [^{3}H]3,4-dihydroxybenzoïque et de [^{14}C]α-naphtol dans les ménaquinones de différentes espèces bactériennes, gram-positives ou gram-négatives. Nous avons de plus effectué quelques essais comparés d'incorporation de [^{14}C]2-méthyl-1,4-naphtoquinone (ménadione) et de [^{14}C]1,4-naphtoquinone dans les ménaquinones de deux espèces bactériennes.

Ce travail fait partie de la thèse de doctorat de Mme M. Guérin (n° A.O. 4079).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes et cultures

Mycobacterium phlei (Legroux) provient de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) et a été cultivé sur milieu de Sauton [13] à 37° pendant 7 jours. *M. phlei* (ATCC 354) a été cultivé sur milieu de Brodie et Gray [14] à 37° pendant 20—25 h. *Mycobacterium avium* (802) provenant de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette) a été cultivé 3 semaines sur milieu de Sauton. *Bacillus megaterium* (NCIB 8508) a été cultivé pendant 24 h à 36° sous une forte aération dans le milieu suivant: glycérol 50 ml, acide citrique 2 g, phosphate bipotassique 0,5 g, sulfate de magnésium (7 H_2O) 0,5 g, citrate de fer ammoniacal 0,05 g, sulfate d'ammonium 1 g, sulfate de zinc 0,1 mg, sulfate de cuivre 0,5 mg, chlorure de calcium 0,5 mg, pour 1 l d'eau (pH ajusté à 7,4). Ce milieu contient en outre: L-tyrosine, L-phénylalanine et L-tryptophane 0,1 mM. *Micrococcus lysodeikticus* (I.P. A 234) a été cultivé sur milieu de Beers [15] pendant 48 h à 25°. *Aerobacter aerogenes* 170-44 (souche fournie par le professeur F. Gibson) est cultivé 24 h à 37° soit sur milieu minimal [4], soit sur le milieu enrichi suivant (milieu *Bactocasaminoacids*): phosphate bipotassique 7 g, phosphate monopotassique 3 g, citrate trisodique 0,5 g, sulfate d'ammonium 1 g, sulfate de magnésium (7 H_2O) 0,1 g, L-tryptophane 20 mg, bactocasaminoacid (Difco) 0,2 g pour 1 l d'eau (pH ajusté à 7,2); on ajoute à ce milieu 2 g de glucose par litre. *Proteus vulgaris* (I.P. A 232) est cultivé 24 h à 37° sur milieu de Davis et Mingioli [16] additionné de 0,1 mg d'acide nicotinique par litre.

Composés radioactifs utilisés

L'acide [1,2-^{14}C]DL-shikimique (0,2 mC/mmole) provient du C.E.A. (Saclay), l'acide [U-^{14}C]D-shikimique (3,33 mC/mmole) de New England Nuclear Corp. (Boston, Mass.), le [1-^{14}C]α-naphtol (19,6 mC/mmole) et la [$^{14}CH_3$]2-méthyl-1.4-naphtoquinone (5,3 mC/mmole) proviennent du Radiochemical Centre (Amersham, Angleterre).

La [1,4,5,8-$^{14}C_4$]1.4-naphtoquinone a été obtenue par oxydation chromique du [1-^{14}C]naphtalène (Radiochemical Centre, Amersham) dans l'acide acétique et purifiée par chromatographie répétée sur couche mince de gel de silice (activité spécifique: 3,7 mC/mmole). La [1-^{14}C]1,4-naphtoquinone a été obtenue par oxydation du [1-^{14}C]α-naphtol par le nitrososulfonate de potassium dans un tampon Tris 0,1 M, pH 7,8, (activité spécifique: 3,1 mC/mmole). L'aldéhyde [^{14}C]p-hydroxybenzoïque marquée dans le noyau (0,2 mC/mmole) et l'aldéhyde [2,5,6-^{3}H]3,4-dihydroxybenzoïque (47 mC/mmole) ont été synthétisés comme décrit précédemment [17].

Ces composés radioactifs généralement dissous dans un petit volume d'éthanol ont été ajoutés aux milieux de culture avant stérilisation (sauf indication contraire) ou directement dans les milieux d'incubation pour les *resting cells*, homogénats, et extraits acellulaires.

Préparation des resting cells, homogénats et extraits acellulaires

Les bactéries sont récoltées au milieu ou en fin de phase exponentielle de croissance, lavées à plusieurs reprises à l'eau et mises en suspension dans un tampon Tris 0,01 M, pH 7,4, contenant 11,5 g KCl/l (*resting cells*).

Les homogénats sont obtenus par sonication à 0°, 10 kHz pendant 4 à 8 min, des bactéries mises en suspension (environ 1 g/ml) dans un tampon Tris 0,01 M, pH 7,8, contenant KCl (11,5 g/l). Les extraits acellulaires sont obtenus par centrifugation à 20000 × *g* pendant 20 min des homogénats précédents.

Isolement et purification des ménaquinones et ubiquinones

Les bactéries ou homogénats sont extraits à l'acétone et les quinones purifiées par chromatographie sur couche mince de silicagel G (Merck) dans différents solvants [18], jusqu'à activité spécifique constante. Leur pureté radiochimique a ensuite été testée par chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de nitrate d'argent [19] et par chromatographie sur papier imprégné de vaseline pour les ménaquinones [19] et sur papier siliconé pour les ubiquinones [20]. Les chromatogrammes obtenus sont découpés en bandes minces qui sont comptées par scintillation liquide.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Dosage spectrophotométrique des ubiquinones et des ménaquinones

Les ubiquinones et ménaquinones sont dosées respectivement dans le cyclohexane à 272 nm (ε = 15000) et 271 nm (ε = 17400). Pour le dosage de la ménaquinone-8 et de l'ubiquinone-8 en mélange dans les extraits de *A. aerogenes*, l'extrait acétonique bactérien évaporé et repris dans le cyclohexane (2 ml) a été lavé par 2 ml de méthanol, 0,1 ml d'eau étant ajouté avant centrifugation pour séparer les phases. On effectue un spectre de différence (oxydé/réduit par KBH_4) sur la phase cyclohexanique diluée dans l'éthanol tamponné par 2 vol.-% d'acétate d'ammonium M. Les concentrations molaires en ubiquinone et ménaquinone sont données par les équations suivantes:

$$c_Q = -\Delta A_{294}/8750$$

et

$$c_{MK} = (\Delta A_{248}/32700) + 0{,}076\ c_Q.$$

Oxydation des ménaquinones en acide phtalique

200 μmoles de ménaquinone sont dissoutes dans 30 ml de pyridine additionnée de 3 gouttes d'eau. On chauffe à 65–70° et on ajoute en l'espace de 6 h, 2 g de permanganate de potassium par portions. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé à sec, repris dans 10 ml d'eau, acidifié par de l'acide sulfurique (500 g/l) et décoloré par addition de métabisulfite de sodium, puis extrait en continu à l'éther pendant 20 h. L'acide phtalique obtenu est séparé d'une huile résiduelle par chromatographie sur plaque de cellulose (Merck) (éthanol–ammoniaque–eau, 80:16:4, v/v/v). La bande d'acide phtalique est acidifiée par pulvérisation d'acide chlorhydrique (100 g/l) et éluée par extraction continue à l'éther.

L'acide phtalique est ensuite purifié jusqu'à activité spécifique constante soit par cristallisation dans le chloroforme, soit par sublimation sous vide (140–145°; 0,2 mm Hg).

Décarboxylation de l'acide phtalique

A 30 mg d'acide phtalique en suspension dans 1 ml de quinoléine (Fluka), on ajoute 100 mg de chromite de cuivre. Ce mélange est porté à ébullition pendant 1 h 30 min et le gaz carbonique dégagé, entraîné par un courant d'azote, est recueilli dans 4 ml de soude 2 N décarbonatée. Celle-ci est ensuite traitée par 5 ml de chlorure de baryum (100 g/l) et le précipité de carbonate de baryum obtenu est centrifugé, lavé à l'eau et à l'acétone puis séché. Le comptage est effectué à l'aide d'un scintillateur Packard 3314 sur une suspension de 10 à 20 mg de carbonate dans 16 ml de toluène contenant 4 g de PPO, 0,3 g de diméthyl-POPOP et 50 g de CabO-Sil par litre, avec une efficacité moyenne de 80%.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Incorporation de l'acide shikimique

L'acide [U-^{14}C]D-shikimique et l'acide [1,2-$^{14}C_2$]-DL-shikimique sont incorporés dans les ménaquinones par des cultures de *M. phlei* et *P. vulgaris* (Tableau 1). L'addition d'amino-acides aromatiques aux milieux de culture, à des concentrations analogues à celles qui provoquent la répression maximale de la synthèse endogène d'acide shikimique chez *A. aerogenes* et *Escherichia coli* [22] permet une augmentation importante (environ 5 fois par rapport aux cultures sans amino-acides) de l'activité spécifique de la dihydroménaquinone de *M. phlei*. Même dans ces conditions, l'incorporation reste faible chez *P. vulgaris*, l'ubiquinone étant cependant 7 fois plus marquée que la ménaquinone. Parson et Rudney [23] ont montré de même que l'acide shikimique exogène n'était pratiquement pas incorporé dans l'ubiquinone de *Rhodospirillum rubrum*.

Tableau 1. *Incorporation d'acide [^{14}C]shikimique par des cultures de* M. phlei *et* P. vulgaris

Bactéries	Précurseur		Radioactivité spécifique: Ménaquinone	Radioactivité spécifique: Ubiquinone
			dés. × min^{-1} × µmole^{-1}	
M. phlei (Legroux)	Acide [U-^{14}C]-shikimique	5,0 µC/l	900	—
	Acide [1,2-$^{14}C_2$]-shikimique	5,0 µC/l	876[a]	—
		8,4 µC/l	1600	—
		25,0 µC/l	7500	—
		5,0 µC/l[b]	4800	—
		10,0 µC/l[b]	7800	—
P. vulgaris	Acide [1,2-$^{14}C_2$]-shikimique	1,0 µC/l[b]	40	285

[a] Moyenne de 4 cultures.

[b] Milieux additionnés des amino-acides aromatiques suivants: tyrosine et phénylalanine 1 mM, tryptophane 0,2 mM.

Tableau 2. *Dégradation de la dihydroménaquinone-9 de* M. phlei *marquée par l'acide [^{14}C]shikimique*

Précurseur	Radioactivités spécifiques: Dihydroménaquinone-9	Acide phthalique		CO_2	
	dés. × min^{-1} × µmole^{-1}	dés. × min^{-1} × µmole^{-1}	%	dés. × min^{-1} × µmole^{-1}	%
Acide [1,2-^{14}C]-shikimique	457	368	81	—	—
	450	396	88	—	—
Acide [U-^{14}C]-shikimique	170	115	68	8,45	7,3

La dégradation de la dihydroménaquinone-9 de *M. phlei* (Tableau 2) marquée par l'acide [U-^{14}C]- ou [1,2-^{14}C]shikimique, indique, en accord avec les résultats de Campbell *et al.* [5] et Cox et Gibson [4] une certaine *randomisation*, plus importante avec l'acide [U-^{14}C]shikimique. La plus grande partie de la radioactivité est cependant localisée dans la portion aromatique du noyau ménaquinonique comme le montre l'activité spécifique de l'acide phtalique obtenu par dégradation oxydative. Dans le cas de l'acide [U-^{14}C]shikimique, la décarboxylation de l'acide phtalique fournit du carbonate radioactif dont l'activité spécifique représente 7,3% de celle de l'acide phtalique de départ. L'incorporation du carboxyle de l'acide [U-^{14}C]shikimique (activité spécifique 14,3% [24]) dans l'un des deux carbonyle quinoniques de la ménaquinone doit fournir, après décarboxylation, compte tenu de la présence de deux carboxyles équivalents dans l'acide phtalique, une activité spécifique moyenne de 7,15% dans le carbonate, très proche du résultat observé.

Incorporation d'aldéhydes aromatiques hydroxylés

L'aldéhyde [^{14}C]p-hydroxybenzoïque n'est incorporé ni dans la dihydroménaquinone-9 par *M. avium*, ni dans la ménaquinone-8 par *P. Vulgaris*, en croissance ou à l'état de *resting cells* (Tableau 3). Dans les mêmes conditions, une radioactivité notable est incorporée dans l'ubiquinone-8 de *P. vulgaris*: rappelons que Chen et Bohm [9] avaient trouvé une incorporation spécifique de l'acide *p*-hydroxybenzoïque dans la lawsone de *Impatiens balsamina*; ce résultat a ensuite été contesté par Zenk et Leistner [7]. L'aldéhyde *p*-hydroxybenzoïque a été identifié comme un présurseur direct des ubiquinones chez *R. rubrum* [25], *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae* [26] et chez le rat [27].

L'aldéhyde 3,4-dihydroxybenzoïque, autre métabolite de l'acide shikimique a été considéré par Cox et Gibson comme un intermédiaire possible dans la biosynthèse du noyau ménaquinonique, sur la base d'expériences de dilution de l'incorporation de l'acide [^{14}C]shikimique dans la ménaquinone-8 de *E. coli* [3]; cette dilution était spécifique de la ménaquinone, l'incorporation dans l'ubiquinone restant inchangée. En outre, l'addition de 10 µmoles/l d'aldéhyde dihydroxybenzoïque au milieu de culture de *A. aerogenes* 170-44 (mutant ne synthétisant pas de ménaquinone) avait pour résultat la synthèse de vitamine K [4].

En fait, ni *M. phlei*, ni *P. vulgaris* n'incorporent de radioactivité décelable dans leur ménaquinone, lorsque ces bactéries sont cultivées ou incubées en présence d'aldéhyde [2,5,6-^{3}H]3,4-dihydroxybenzoïque, bien qu'une radioactivité notable soit retrouvée dans l'extrait bactérien. Le même résultat a été obtenu avec le mutant 170-44 d'*Aerobacter aero-*

genes; même en présence de 10 à 50 μmoles d'aldéhyde par litre, il nous a été impossible de déceler, chez celui-ci, la formation de ménaquinone décrite par Cox et Gibson.

Des résultats négatifs analogues ont été précédemment rapportés [5,6] pour l'utilisation d'aldéhyde ou d'acide [7-^{14}C]3,4-dihydroxybenzoïque.

Incorporation d'α-naphtol

Leistner et coll. ont isolé la ménaquinone-7 radioactive à partir de *B. megaterium* cultivé en présence de [1-^{14}C]α-naphtol et trouvé que la radioactivité était localisée dans les carbonyles quinoniques [6]. Cependant, Brown et coll. n'ont pu confirmer ce résultat, l'incorporation de [^{14}C]α-naphtol dans la ménaquinone de *B. megaterium* restant négligeable: ces auteurs ont cependant constaté la présence de contaminants radioactifs difficilement séparables des ménaquinones [12].

Nous avons éprouvé la même difficulté dans nos essais d'incorporation du [1-^{14}C]α-naphtol: les résultats du Tableau 4 montrent que la simple purification des ménaquinones sur couche mince est insuffisante. Nous avons dû utilisier en outre la chromatographie en phase inversée (papier imprégné de vaseline) ou la chromatographie sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent. Après ce traitement, la radioactivité incorporée dans les ménaquinones de *M. phlei* et *M. lysodeikticus* est très faible bien que dans chaque cas une quantité importante de radioactivité soit retrouvée dans les bactéries. Par contre, les ménaquinones de *B. megaterium* et *P. vulgaris* présentent un marquage bas (très inférieur à celui obtenu par Leistner et coll. [6]) mais significatif.

Tableau 3. *Incorporation d'aldéhyde [^{14}C]p-hydroxybenzoïque et d'aldéhyde [^{3}H]3,4-dihydroxybenzoïque*

Culture	Précurseur		Radioactivité spécifique	
			Ménaquinone	Ubiquinone
		μC/l	dés. × min^{-1} × μmole^{-1}	
M. avium	Aldéhyde [^{14}C]*p*-hydroxybenzoïque	11	0	—
M. phlei (Legroux)	Aldéhyde [^{3}H]dihydroxybenzoïque	1	0	—
P. vulgaris	Aldéhyde [^{14}C]*p*-hydroxybenzoïque	1	0	652
	Aldéhyde [^{3}H]dihydroxybenzoïque	0,2	0	0
A. aerogenes 170-44	Aldéhyde [^{3}H]dihydroxybenzoïque	1	0	0
Resting cells				
P. vulgaris	Aldéhyde [^{14}C]*p*-hydroxybenzoïque	10	0	2364
	Aldéhyde [^{3}H]dihydroxybenzoïque	1	0	0
A. aerogenes 170-44	Aldéhyde [^{3}H]dihydroxybenzoïque	1	0	0

Tableau 4. *Incorporation de [1-^{14}C]α-naphtol*

		Volume de milieu	Ménaquinone	Radioactivités spécifiques après purification par:			Ubiquinone	
				CCM[a]	CCM[a] + CPI[b]	CCM[a] + $AgNO_3$[c]		Radioactivité spécifique
	μC	l	μmoles	dés. × min^{-1} × μmole^{-1}			μmoles	dés. × min^{-1} × μmole^{-1}
M. phlei[d]	10	2	—	—	—	89	—	—
Legroux	20	2	33,4	2100	35	—	—	—
	40	4	35	—	—	21	—	—
M. phlei[e]	10	2	2,4	—	103	—	—	—
ATCC 354	12	3	9	447	11	—	—	—
M. lysodeikticus[e]	10	2	2,6	259	0	—	—	—
B. megaterium[e]	50	10	2,1	455	350	—	—	—
P. vulgaris[e]	70	7	0,88	595	465	—	0,9	0

[a] CCM, chromatographie sur couche mince.
[b] CPI, chromatographie sur papier en phase inversée.
[c] $AgNO_3$, chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de $AgNO_3$.
[d] α-naphthol stérilisé avec le milieu de culture.
[e] α-naphthol non stérilisé, ajouté en solution alcoolique.

Tableau 5. *Incorporation de [1-¹⁴C]α-naphtol dans les quinones d'*A. aerogenes *170-44*

α-Naphthol	Volume de milieu	Ménaquinone-8	Radioactivités spécifique CCM[a]	CCM[a] + CPI[b]	CCM[a] + $AgNO_3$[c]	Ubiquinone-8	Activité spécifique
μC	l	μmoles	dés.×min⁻¹×μmole⁻¹			μmoles	dés.×min⁻¹ ×μmole⁻¹
20	5[d]	0,15	2192	1936	—	—	0
120	12[d]	0,24	8305	7930	—	—	—
80	8[d]	0,64	3500	2020	2186	0,7	0
10	0,1[e]	1,1	2900	0	0	2,9	0

[a] CCM, chromatographie sur couche mince.
[b] CPI, chromatographie sur papier en phase inversée.
[c] $AgNO_3$, chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné de $AgNO_3$.
[d] Bactéries cultivées en milieu "Bactocasaminoacid" additionné de [1-¹⁴C]α-naphthol.
[e] Bactéries lavées obtenues à partir de 8 l de milieu, "Bactocasaminoacid" et incubées dans un tampon tris pH 7,4 avec le [1-¹⁴C]α-naphthol pendant 3 heures à 37°.

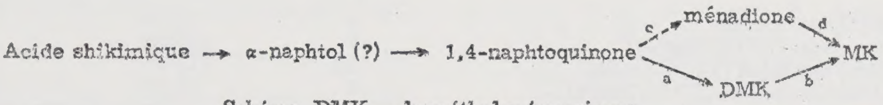

Schéma. DMK = desméthyl-ménaquinone

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec la souche 170-44 d'*A. aerogenes* (Tableau 5). Ce mutant cultivé en milieu minimal, même additionné d'α-naphtol ne synthétise pas de ménaquinone. Cependant, en présence de «Bactocasaminoacid» (voir partie expérimentale), il en synthétise environ 0,08 μmole par gramme de bactéries (poids sec): de plus, dans ces conditions, l'addition au milieu de [1-¹⁴C]α-naphtol conduit à une incorporation notable dans la ménaquinone synthétisée, l'activité spécifique restant constante après chromatographie répétée. Par contre, les bactéries lavées, préparées à partir du milieu enrichi et incubées ensuite avec le [1-¹⁴C]-α-naphtol n'incorporent aucune radioactivité dans la ménaquinone. Dans tous les cas, aucune radioactivité ne peut être décelée dans l'ubiquinone-8 (purifiée par chromatographie en phase inversée, ou sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent). La faible incorporation observée dans les cellules en croissance bien que significative ne permet pas cependant, en raison de la très forte dilution de la radioactivité spécifique par rapport au précurseur (*cf.* Tableau 7), de conclure à un rôle d'intermédiaire pour l'α-naphtol.

Incorporation de [¹⁴C]1,4-naphtoquinone et de [¹⁴C]ménadione

La 1,4-naphtoquinone et la ménadione sont deux précurseurs potentiels de la partie quinonique des ménaquinones bactériennes. Martius et Leuzinger [28] ont montré surtout l'incorporation de ménadione chez *Fusiformis nigrescens*, bactérie anaérobie exigeante en vitamine K. Cependant, il ressort des études préliminaires de Lev [29] que cette bactérie utilise aussi bien ou mieux la 1,4-naphtoquinone que la ménadione. D'autre part, il existe chez *Mycobacterium phlei* un système enzymatique capable de méthyler les desméthyl-ménaquinones *in vitro* [13]. Il reste donc une certaine incertitude sur les étapes terminales de la biosynthèse des ménaquinones selon que l'on considère ou non la ménadione comme un intermédaire (*cf.* Schéma).

M. phlei n'a pu être utilisé pour tester ces précurseurs car cette bactérie n'incorpore ni la [¹⁴C]1,4-naphtoquinone, ni la [¹⁴C]ménadione.

A. aerogenes 170-44 cultivé en milieu minimal, additionné de 1,4-naphtoquinone ou de ménadione froide (0,5 μM) ne synthétise pas de quantité détectable de ménaquinone (Tableau 6). Par contre, comme dans le cas du [¹⁴C]naphtol (*cf.* ci-dessus), la [¹⁴C]ménadione ou la [¹⁴C]1,4-naphtoquinone additionnés au milieu «Bactocasaminoacid» conduisent à une incorporation spécifique importante dans la ménaquinone-8 (Tableau 7). La dégradation de la ménaquinone-8 marquée à partir de la [¹⁴C]1,4-naphtoquinone a fourni un acide phtalique contenant plus de 90% de la radioactivité spécifique de la ménaquinone.

La comparaison des activités spécifiques des précurseurs et de la ménaquinone-8 obtenue indique que la 1,4-naphtoquinone est environ 20 fois moins diluée que la ménadione, et environ 500 fois moins diluée que l'α-naphtol (Tableau 7).

D'autre part, en cultivant *Aerobacter aerogenes* 170-44 sur milieu «Bactocasaminoacid» additionné de [¹⁴C]1,4-naphtoquinone et de quantités croissantes de ménadione froide on constate qu'une diminution sensible de l'incorporation dans la ménaquinone-8

Tableau 6. *Biosynthèse de ménaquinone-8 et ubiquinone-8 par* A. aerogenes *en présence de précurseurs quinoniques éventuels*

Souches	Milieu de culture	Ménaquinone-8	Ubiquinone-8
		µmoles/g poids sec	
NCW	Milieu minimal	0,19	0,13
	Milieu BCA [a]	0,57	0,73
170-44	Milieu minimal	< 0,001	0,20
	Milieu minimal + 1,4-naphtoquinone (0,5 µM)	< 0,001	0,11
	Milieu minimal + 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (0,5 µM)	< 0,001	0,11
	Milieu BCA [a]	0,073	0,38

[a] BCA = Bactocasaminoacids.

Tableau 7. *Incorporation et dilution de précurseurs aromatiques éventuels de la ménaquinone-8 chez* A. aerogenes *170-44 en milieu «Bactocasaminoacids»*

		Activité spécifique de la ménaquinone-8	Activité spécifique MK-8 [a] / Activité spécifique précurseur
	µC/l	dés. × min^{-1} × µmole^{-1}	
[1-^{14}C]α-Naphtol (19,6 µC/µmole)	4	2000	0,0000465
[1-^{14}C]1,4-Naphtoquinone (3,11 µC/µmole)	3	150000	0,0220
[1,4,5,8-^{14}C]1,4-Naphtoquinone (3,7 µC/µmole)	2,5	310000	0,0380
2-[^{14}C-méthyl]1,4-naphtoquinone (5,3 µC/µmole)	3	19000	0,0016

[a] MK-8 = ménaquinone-8.

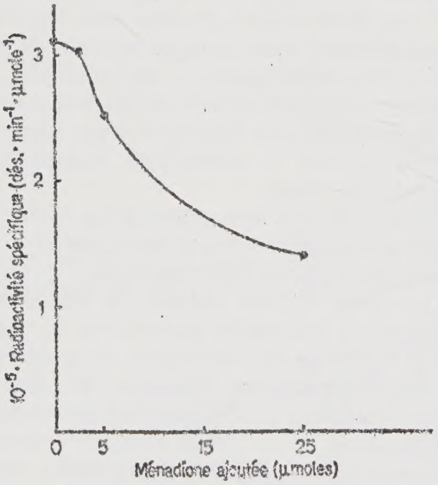

Fig. 1. *Activité spécifique de la ménaquinone-8 de* A. aerogenes *170-44 cultivé en présence de 0,5 µmole (= 2 µC)/litre de [1,4,5,8-^{14}C]naphtoquinone et de 2-méthyl-1,4-naphtoquinone*

n'intervient qu'en présence d'un excès important de ménadione (Figure): pour 50 équivalents de ménadione ajoutés on observe encore 50% d'incorporation de la [^{14}C]1,4-naphtoquinone dans la ménaquinone-8.

Ces résultats semblent indiquer que la 1,4-naphtoquinone est bien mieux utilisée que la ménadione pour la biosynthèse de la ménaquinone-8 de *A. aerogenes* (*cf.* Schéma, voie a + b). On peut même envisager que la ménadione ne soit pas un intermédiaire réel (voie c exclue) mais soit seulement utilisée (voie d), ou par les hétérotrophes (*Fusiformis nigrescens* [28]) ou lorsqu'elle est fournie en excès dans le milieu de culture. Il est difficile cependant de considérer comme définitif ce schéma de biosynthèse aussi bien en ce qui concerne l'α-naphtol que la 1,4-naphtoquinone et la ménadione, en raison des conditions très particulières dans lesquelles a lieu leur incorporation: aucun des précurseurs cités ne permet en effet à *A. aerogenes* 170-44 de synthétiser la ménaquinone-8 en quantité détectable en milieu minimal; ils ne sont incorporés qu'en présence de milieu «Bactocasaminoacid» et avec une dilution importante.

L'une des interprétations possible est que le milieu «Bactocasaminoacid» contient un précurseur de la ménaquinone-8 (même plus éloigné que l'α-naphtol ou la 1,4-naphtoquinone) pénétrant très facilement dans la bactérie, d'ou les très fortes dilutions de radioactivité spécifique observées. Dans cette hypothèse, on devrait constater au moins la même incorporation totale de [^{14}C]α-naphtol ou de [^{14}C]1,4-naphtoquinone en l'absence de «Bactocasaminoacid» et en l'absence de synthèse détectable de ménaquinone. Or, dans ces conditions, après addition de ménaquinone-8 froide, et purification de cette ménaquinone, la radioactivité totale incorporée dans la ménaquinone-8 est nulle en présence de [^{14}C]α-naphtol et ne représente que 4% de celle trouvée en milieu «Bactocasaminoacid» pour l'incorporation de la [^{14}C]1,4-naphtoquinone. Ces résultats indiquent que le rôle du milieu «Bactocasaminoacid» dans la biosynthèse de la ménaquinone-8 ne se ramène pas seulement à celui d'un précurseur.

Nous remercions Monsieur P. Dansette pour la préparation des aldéhydes [^{14}C]p-hydroxybenzoïque et [^{3}H]dihydroxybenzoïque, Madame Scherrer pour l'isolement de la ménaquinone de *Mycobacterium avium* et le Professeur F. Gibson pour les souches de *A. aerogenes*. Nous remercions aussi le Professeur E. Lederer pour l'intérêt constant porté à ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Friis, P., Doyle-Daves, G., et Folkers, K., *J. Amer. Chem. Soc.* 88 (1966) 4754.
2. Friis, P., Lars, J., Nilsson, G., Doyle-Daves, G., et Folkers, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 324.
3. Cox, G. B., et Gibson, F., *Biochim. Biophys. Acta,* 93 (1964) 204.
4. Cox, G. B., et Gibson, F., *Biochem. J.* 100 (1966) 1.
5. Campbell, I. M., Coscia, C. J., Kelsey, M., et Bentley, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 25.
6. Leistner, E., Schmitt, J. H., et Zenk, M. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 845.
7. Zenk, M. H., et Leistner, E., *Z. Naturforsch.* 22b (1967) 460.
8. Leistner, E., et Zenk, M. H., *Z. Naturforsch.* 23b (1968) 258.
9. Chen, D., et Bohm, B. A., *Can. J. Biochem.* 44 (1966) 1389.
10. Guérin, M., Azerad, R., et Lederer, E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 187.
11. Bohm, B. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26 (1967) 621.
12. Brown, B. S., Whistance, G. R., et Threlfall, D. R., *FEBS Letters,* 1 (1968) 323.
13. Sauton, B., *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci (Paris),* 155 (1912) 860.
14. Brodie, A. F., et Gray, C. T., *J. Biol. Chem.* 219 (1956) 853.
15. Beers, R. F., jr., *Science,* 122 (1955) 1016.
16. Davis, B. D., et Mingioli, E. S., *J. Bacteriol.* 60 (1950) 17.
17. Dansette, P., et Azerad, R., *Bull. Soc. Chim.* 6 (1968) 2492.
18. Azerad, R., Bleiler-Hill, R., Catala, F., Samuel, O., et Lederer, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 253.
19. Beau, S., Azerad, R., et Lederer, E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48 (1966) 569.
20. Lester, R. L., et Ramasarma, T., *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 672.
21. Sommer, P., et Kofler, M., *Vitamins Hormones,* 24 (1966) 349.
22. Gibson, F., et Pittard, J., *Bacteriol. Rev.* 32 (1968) 465.
23. Parson, W. W., et Rudney, H., *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 1855.
24. Olesen, Larsen, P., *Biochim. Biophys. Acta,* 141 (1967) 27.
25. Rudney, H., et Parson, W. W., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 3137.
26. Parson, W. W., et Rudney, H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 51 (1964) 444.
27. Olson, R. E., Bentley, R., Aiyar, A. S., Dialameh, G.H., Gold, P. H., et Ramsey, V. G., *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 3146.
28. Martius, C., et Leuzinger, W., *Biochem. Z.* 340 (1964) 304.
29. Lev, M., J. *Gen. Microbiol.* 20 (1959) 697.

M. Guérin, M. M. Leduc et R. G. Azerad
Institut de Biochimie, Faculté des Sciences
F-91 Orsay, France